

[原 著]

## DMBA 頬嚢癌形成過程における TPA 塗布の GGT 陽性巣に対する効果

館山 美樹, 中出 修, 大内 知之, 八重樫和秀,  
吉川 泰子, 賀来 亨, 奥山 富三

東日本学園大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 奥山 富三 教授)

## Effect of Applications of TPA for GGT-Positive Foci during DMBA-Induced Cheek Pouch Carcinogenesis of the Hamster

Miki TATEYAMA, Osamu NAKADE, Tomoyuki OHUCHI,  
Kazuhide YAEGASHI, Yasuko KICHIKAWA, Tohru KAKU,  
and Tomizo OKUYAMA

Department of Oral Pathology, School of Dentistry,  
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Prof. Tomizo OKUYAMA)

### Abstract

The effect of repeated applications of the skin-tumor promoter 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) following treatment with the carcinogen 0.5% 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in mineral oil (DMBA) was examined in hamster cheek pouch carcinogenesis.

The animals were divided into three groups in our experiment. The animals in Group 1 were treated with biweekly topical applications of DMBA for 5 weeks followed by biweekly applications of TPA during the experiment. The animals in Group 2 were treated with DMBA for 5 weeks and then left untreated during the experiment. The animals in Group 3 used as control were treated with mineral oil for 5 weeks followed by biweekly applications of TPA during the experiment.

$\gamma$ -glutamyl transpeptidase stained cells were rapidly induced in the epithelium of

---

受付: 昭和61年5月21日

本論文の要旨は東日本学園大学歯学会第4回学術大会(昭和61年2月15日)において発表した。

hamster cheek pouch treated with biweekly applications of DMBA. During the five consecutive weeks of DMBA treatment progressively numerous GGT-stained epithelial cell populations ( $715 \pm 219$  foci/ $10\text{cm}^2$ ) and larger GGT-positive foci up to about 0.90 mm in diameter were encountered. The majority of the GGT-positive foci induced by 10 applications of DMBA disappeared when carcinogen application was discontinued both in Group 1 and in Group 2. A comparison of GGT-positive foci at the completion of the DMBA regimen and at 10 weeks thereafter revealed no significant decrease in the size of foci in both Group 1 and Group 2.

In the present study, the tumor promoter, TPA, is shown to be ineffective in increasing of numbers and size of GGT-positive foci after DMBA application was discontinued.

**Key words :** DMBA, TPA, GGT-positive foci, cheek pouch carcinogenesis

## 緒 言

$\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) は Hanes ら<sup>1)</sup>によってグルタチオン代謝に必要な酵素として、初めて報告された。この酵素は glutamyl 基を  $\gamma$ -glutamylpeptide から他の peptide, あるいはアミノ酸へ転送する酵素で, glutamyl cycle を構成し, 細胞膜でアミノ酸の転送に関与していると考えられている。この酵素は生体内の各臓器に広く分布しており, 腎, 脾, 小腸などに特に強い活性が認められ, 肝の活性は低いことが報告されている<sup>2)</sup>。一方, 個体発生の過程で GGT の臓器分布は特異な変動を示し, 胎生肝では成人肝の10倍以上の活性を示している<sup>3)</sup>。また実験的肝癌形成過程の前癌病変と考えられている増生結節や肝癌でその活性が高く, 肝癌あるいは肝の前癌状態のマーカー・エンザイムと考えられている<sup>4-8)</sup>。その他皮膚<sup>9-11)</sup>大腸<sup>12)</sup>などの実験的化学発癌についても GGT 活性の-highいことが報告されている。正常頬嚢粘膜上皮に, GGT 活性が認められないことから最近, ハムスターの頬嚢癌形成過程の解析のためのマーカー・エンザイムとして注目されている<sup>13-16)</sup>すなわち, 発癌剤の処置によって頬嚢上皮の基底層に GGT

活性陽性細胞が出現する。この GGT 陽性細胞は initiated cell (前癌細胞) と考えられ, この陽性細胞巣はここを場として腫瘍へ進展することが示唆されている<sup>13-15)</sup>。ハムスター頬嚢癌では GGT 活性は増殖能を有する腫瘍細胞層より分化した層に局在することが知られており, GGT 陽性細胞を initiated cell とする考えに異論がある<sup>16)</sup>。

今回, われわれは, ハムスター頬嚢に発癌剤 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (DMBA) を塗布し, 発癌剤の塗布により生じたと思われる initiated cell が promoter として知られている 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)<sup>11, 17-19)</sup>塗布により, DMBA 塗布により出現した GGT 陽性細胞巣の経時的变化を検索し, TPA の GGT 陽性巣に対する効果の有無について実験を行った。

## 材料ならびに方法

### 1. 実験動物および処置

実験動物は生後約2か月の雄ハムスターを用い, 固型飼料で養い, 常時水を与えた。発癌剤は0.5% DMBA ミネラルオイル溶液とし, 実験方法は Fig. 1 に示した如くで, 3群とした。

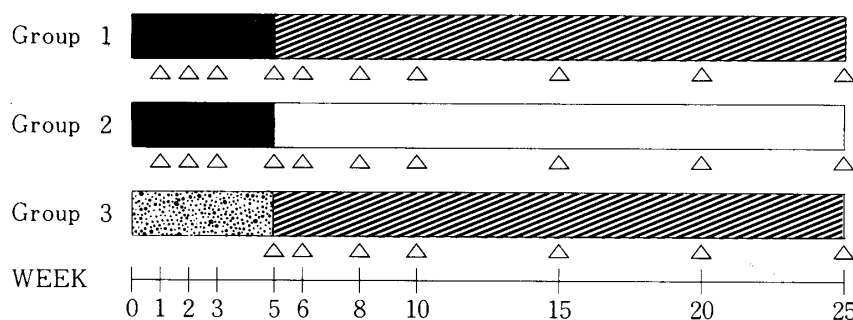


Fig. 1 Diagrammatic representation of cheek pouch treatment.

■ : period of biweekly topical applications of DMBA ;  
 ▨ : period of biweekly topical applications of TPA ;  
 ▩ : period of mineral oil treatment ;  
 □ : treatment-free periods.

DMBA を週 2 回、実験開始後 5 週まで、計 10 回塗布し、以後、1 群は TPA・アセトン溶液 (20 mmol) を週 2 回塗布し、また、2 群は 5 週以後無処置とした。3 群はミネラルオイルを週 2 回、以後、1 群と同様に TPA アセトン溶液を週 2 回塗布し、コントロールとした。DMBA 塗布開始後、1, 2, 3, 5 週、塗布中止後 1, 3, 5, 10, 20 週と動物を屠殺した (Fig. 1)。

## 2. GGT 組織化学

ハムスター頬嚢粘膜を取出し、4℃の 1% 酢酸溶液中で、1 時間攪拌したのち、粘膜を蒸留水の入ったシャーレにうつし、粘膜上皮のみを剝離し、上皮は基底面を上にし、スライド・ガラスにはりつけた<sup>13,14)</sup> Rutenberg ら<sup>20)</sup>の方法に準じて GGT 組織化学染色を行った。

## 3. GGT 陽性巣の解析

GGT 陽性巣の数を検索するために、各々の頬嚢の面積を Kontron MOP 画像解析装置を用いて測定し、GGT 陽性巣の数を顕微鏡下で算定し、単位面積あたりの陽性巣の数で、各実験群のハムスター頬嚢について評価を行った。

GGT 陽性巣の大きさは接眼マイクロメーターで (長径+短径)÷2 として陽性巣の直径として測定した。GGT 陽性巣は大きさ、形、染色性の強さに関係なく、数および直径を測定した。

## 結 果

### 1. DMBA 塗布中の GGT 陽性巣の解析

0.5% DMBA ミネラル・オイル溶液を週 2 回頬嚢に塗布し、5 週まで、すなわち、計 10 回 DMBA を塗布した。その間、1 週、2 週、3 週、5 週と経時的に動物を屠殺し、[材料ならびに方法] の項で示した方法により、剝離頬嚢粘膜上皮の組織化学的検索を行った。

DMBA 塗布回数が増すに従い、GGT 陽性巣 (Fig. 2, Table 1) および GGT 陽性巣の大きさの増大が認められる (Fig. 3, Table 2)。GGT 陽性巣の数は 3 週すなわち 6 回塗布 ( $178 \pm 81/10\text{cm}^2$ ) (Fig. 4) と 5 週、すなわち 10 回塗布 ( $715 \pm 219/10\text{cm}^2$ ) (Fig. 5) との間に著しい数の増加が認められる。また GGT 陽性巣の大きさ (Fig. 3, Table 2) は DMBA 塗布回数が増すに従い大きくなる。すなわち 2 回塗布では  $0.11 \pm 0.09\text{mm}$ 、6 回塗布では  $0.42 \pm 0.19\text{mm}$ 、10 回塗布では  $0.72 \pm 0.20\text{mm}$  で、2 回塗布では大きさがほぼ均一で、塗布回数が増すに従い、大きさの不均一性が目立つ (Figs. 3, 4 and 5, Table 2)。

### 2. DMBA 塗布中止後の GGT 陽性巣の解析

DMBA 5 週、すなわち 10 回塗布し、その後 promoter として知られている TPA を塗布した

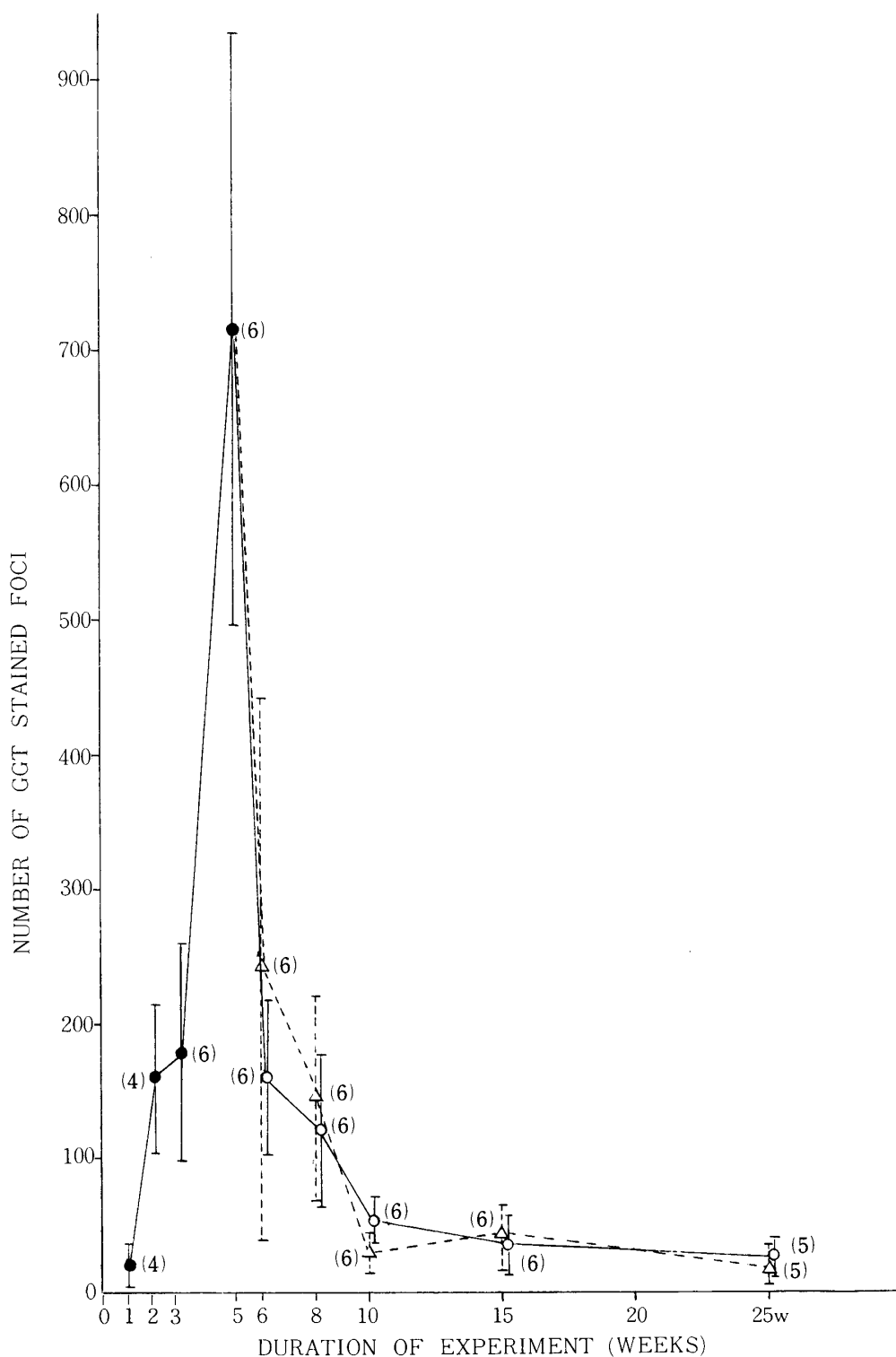


Fig. 2 Quantitation of GGT-positive foci.

Animals were sacrificed on week 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 15 and 25. and whole mounts of detached pouch epithelium were prepared for the histochemical detection of GGT rich foci. The quantitation of GGT stained foci was expressed as the number of foci per 10cm<sup>2</sup> of a surface area. The number of DMBA treated (●), TPA treated (△) and untreated (○) cheek pouches of animals at each period is shown in parenthesis. Bars: S. D.

Table 1. Quantitation of GGT positive foci.

Time of Sacrifice	Group 1		Group 2	
	Treatment	No. of foci <sup>a</sup> per 10cm <sup>2</sup>	Treatment	No. of foci <sup>a</sup> per 10cm <sup>2</sup>
1 w	DMBA <sup>b</sup>	19± 15 (4/5) <sup>d</sup>	DMBA	19± 15 (4/5) <sup>d</sup>
2 w	DMBA	161± 57 (4/4)	DMBA	161± 57 (4/4)
3 w	DMBA	178± 81 (6/6)	DMBA	178± 81 (6/6)
5 w	DMBA	715±219 (6/6)	DMBA	715±219 (6/6)
6 w	TPA <sup>c</sup>	240±202 (6/6)	0 <sup>e</sup>	160± 58 (6/6)
8 w	TPA	145± 75 (6/6)	0	122± 59 (6/6)
10 w	TPA	29± 11 (6/6)	0	52± 17 (6/6)
15 w	TPA	36± 25 (6/6)	0	35± 24 (6/6)
25 w	TPA	21± 14 (5/5)	0	24± 17 (5/5)

The number of foci per 10cm<sup>2</sup> of pouch surface was determined by microscopic examination of whole mounts of detached pouch epithelium stained for GGT histochemical activity.

The animals in Group 1 were treated with DMBA for 5 consecutive weeks and then treated with TPA for the duration of the experiment. The animals in Group 2 were treated with DMBA for 5 consecutive weeks and then left untreated for the duration of the experiment.

a. Mean±Standard Deviation b. 0.5% DMBA in mineral oil c. 10.5μg TPA/0.05ml acetone

d. The fraction of cheek pouches with foci is given in parentheses.

e. 0 represents no treatment

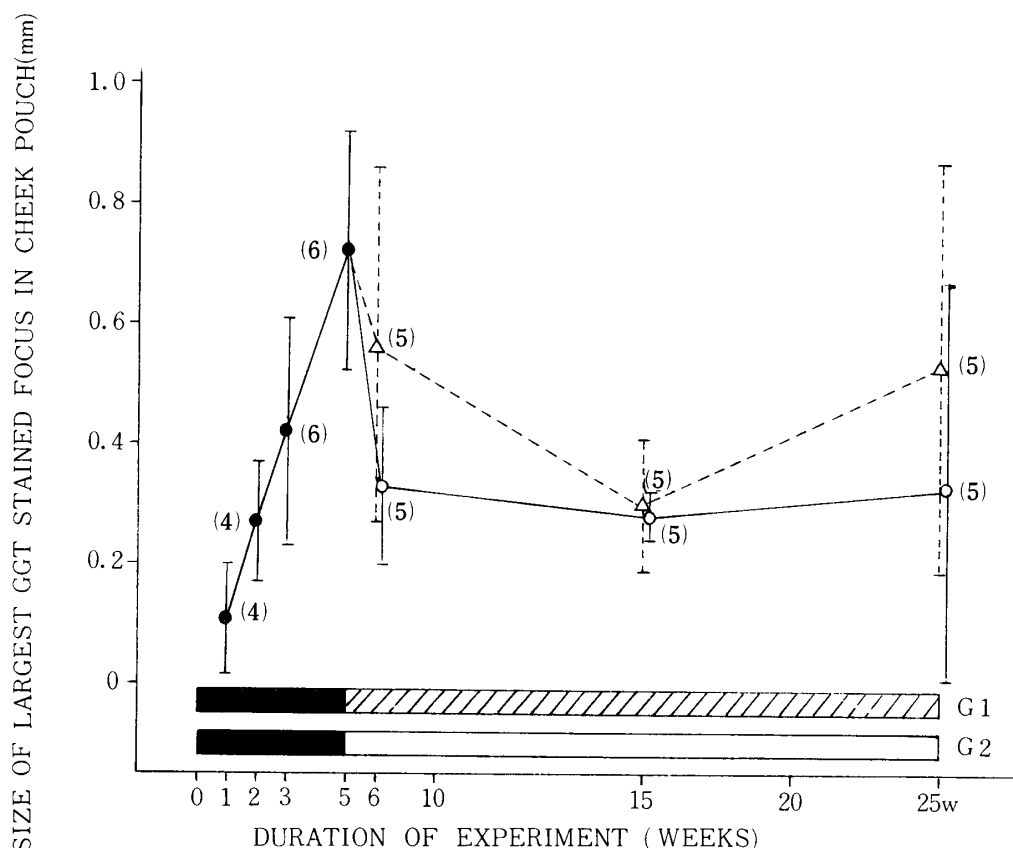


Fig. 3 Maximum size of GGT-positive foci during and after DMBA treatment.

Whole mounts of detached cheek pouch epithelium were stained for GGT histochemical activity, and the size of the largest focus from each cheek pouch was determined using a calibrated ocular micrometer.

Each point on the graph represents the mean largest-focus-size determined from the focus-bearing cheek pouches of animals sacrificed on week 1, 2, 3, 5, 6, 15 and 25. The number of DMBA treated (●), TPA treated (△) and untreated (○) cheek pouches of animals of each period is shown in parenthesis. Bars: S. D.

**Table 2.** Maximum size of GGT-positive foci during and after DMBA treatment

Time of Sacrifice	Group 1		Group 2	
	Treatment	Size of Largest GGT Stained foci (mm) <sup>a</sup>	Treatment	Size of Largest GGT Stained foci (mm) <sup>a</sup>
1 w	DMBA <sup>c</sup>	0.11±0.09 (4) <sup>b</sup>	DMBA	0.11±0.09 (4) <sup>d</sup>
2 w	DMBA	0.27±0.10 (4)	DMBA	0.27±0.10 (4)
3 w	DMBA	0.42±0.19 (6)	DMBA	0.42±0.19 (6)
5 w	DMBA	0.72±0.20 (6)	DMBA	0.72±0.20 (6)
6 w	TPA <sup>d</sup>	0.56±0.29 (5)	0 <sup>e</sup>	0.33±0.16 (5)
15 w	TPA	0.30±0.11 (5)	0	0.28±0.07 (5)
25 w	TPA	0.53±0.34 (5)	0	0.33±0.29 (5)

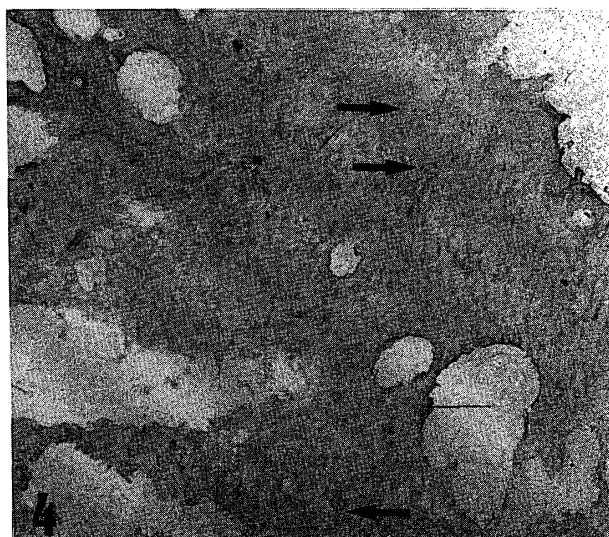
a. Mean ± Standard Deviation

b. Number of focus-bearing cheek pouches evaluated at each sacrifice

c. 0.5% DMBA in mineral oil

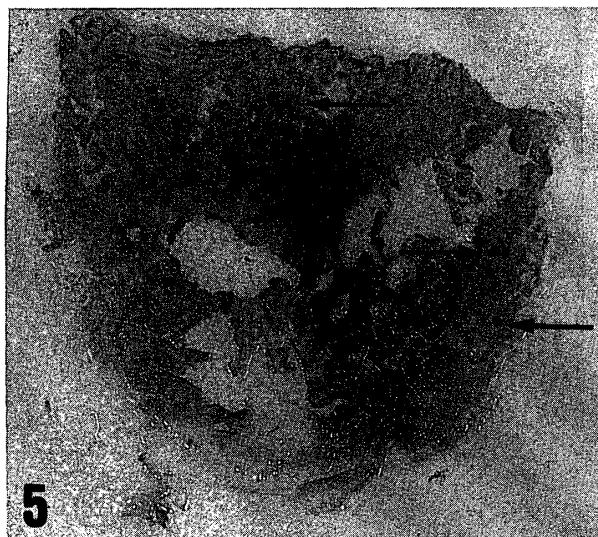
d. 10.5 µg TPA/0.05ml acetone

e. 0 represents no treatment



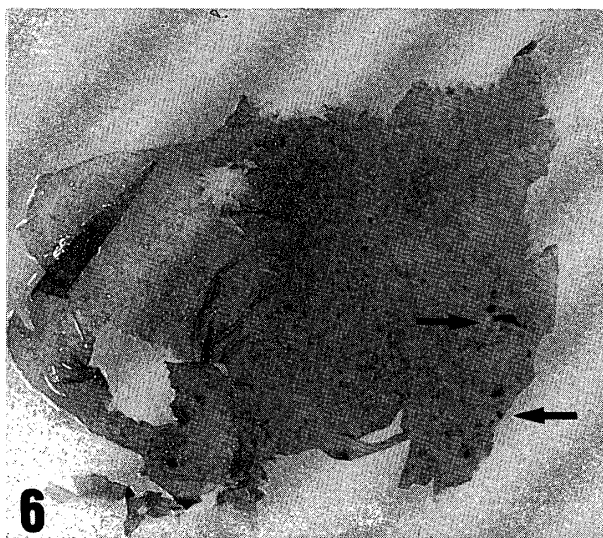
**Fig. 4** Foci of GGT histochemical activity in a whole mount of hamster cheek pouch following 3 weeks of topical DMBA treatment.

Minute foci of GGT stained cells are present (arrow).



**Fig. 5** Foci of GGT histochemical activity in a whole mount of hamster cheek pouch following 5 weeks of topical DMBA treatment.

The number of GGT positive foci increased markedly and the size of the GGT positive foci present in the whole mount also increased markedly (arrow).



**Fig. 6** Foci of GGT histochemical activity in a whole mount of hamster cheek pouch following a 5-week treatment-free interval after a 5-week treatment of topical DMBA solution.

Group 1, DMBA 塗布中止後, 無処置とした Group 2 の 2 群に分け, DMBA 塗布中止後, 各々の群のハムスターを経時的に屠殺し, GGT 陽性巣の数および大きさの推移について検索した。

引続き TPA を週 2 回塗布した Group 1 は, DMBA 塗布中止後, 著しい GGT 陽性巣の数の減少が認められ, とくに, DMBA 塗布中止後 1 週, すなわち, 実験開始後 6 週目で  $240 \pm 202$  foci /  $10\text{cm}^2$  で, 塗布中止後 3 週, すなわち実験開始後 8 週目で,  $145 \pm 75$  foci /  $10\text{cm}^2$ , 10 週 ( $29 \pm 11$  foci /  $10\text{cm}^2$ ) から 25 週 ( $21 \pm 14$  foci /  $10\text{cm}^2$ ) まで, とくに数の変化は認められなかった (Fig. 2, Table 1)。GGT 陽性巣の大きさも DMBA 塗布中止後, 大きさの減少が認められ, DMBA 5 週, 10 回塗布では  $0.72 \pm 0.20\text{mm}$  で, DMBA 塗布中止後, TPA 1 週, すなわち 2 回塗布では  $0.56 \pm 0.29\text{mm}$  と減少が認められ, 以後, 大きさの有意な変化は認められなかった (Fig. 3, Table 2)。

DMBA 塗布中止後, 無処置とした Group 2 では Group 1 と同様で, 時間の経過とともに

数の減少が認められ (Fig. 2 and 6, Table 1) 実験開始後, 10 週 ( $52 \pm 17$  foci /  $10\text{cm}^2$ ) から 25 週 ( $24 \pm 17$  foci /  $10\text{cm}^2$ ) では数の著しい変化は認められなかった。GGT の大きさは DMBA 塗布中止後, 1 週, すなわち, 実験開始後 6 週で  $0.33 \pm 0.16\text{mm}$  と縮小が認められ, 以後の大きさの有意な変化は認められなかった (Fig. 3, Table 2)。

Group 1 と Group 2 と比較すると, 各時期における GGT 陽性巣の数, 大きさでは統計学的に有意差は認められなかった。すなわち, TPA 塗布による頬嚢の GGT 陽性巣の数, 大きさには影響を及ぼさなかった。DMBA 塗布中止後 5 週 (実験開始後 10 週) 以後, GGT 陽性巣の数は Group 1, Group 2 とともに変化なく, GGT 陽性巣が存続することが考えられる。

コントロール群, Group 3, すなわち, 週 2 回, 5 週までミネラル・オイル塗布, その後, TPA 塗布では, 各屠殺時期において, GGT 陽性巣は認められなかった。

## 考 察

今回, われわれは, ハムスター頬嚢に DMBA を塗布し, DMBA 塗布により生じたとされる initiated cell が皮膚二段階発癌過程における promoter として知られている TPA<sup>11, 17-19</sup> 塗布により, DMBA 塗布により出現した GGT 陽性細胞巣の数, 大きさがどのように変化するか, 経時的に動物を屠殺し, 検索した結果 (Group 1), GGT 陽性巣の数, 大きさには, DMBA 塗布後, 無処置した群 (Group 2) と比較すると, 有意な変化は認められなかった (Table 1, 2)。

GGT 陽性巣の大多数は DMBA 塗布中止後, Group 1, Group 2 とともに急激に数の減少が認められ, すなわち, DMBA 5 週塗布後では  $715 \pm 219$  foci /  $10\text{cm}^2$  が, 塗布中止後 5 週, 実験開始 10 週は Group 1  $29 \pm 11$  foci /  $10\text{cm}^2$ , Group

2 では  $52 \pm 17$  foci /  $10\text{cm}^2$  となり、それ以後では数の変化は認められず、GGT の存続することが認められた。Fiala and Fiala<sup>4</sup> によって生化学的な肝癌のマーカーとして提唱された GGT は正常のラット肝細胞には認められないもので、この positive marker は前癌期の増生性病変に高率となることが明らかとなり、前癌期変化の研究に広く利用されている。すなわち、肝癌形成過程に出現する増生結節に組織化学的に均一に GGT 活性が認められるが、発癌剤の投与を中止すると組織化学的に均一に GGT 活性が認められた多くの結節に染色性の不均一性が認められ、多くの増生性病変が remodelling をおこし結節の構成細胞が正常肝細胞と区別のつかないものになり、GGT 陽性の foci の 90% は remodelling により消失するという<sup>6, 20, 21</sup>。ハムスターの頬嚢癌形成過程に出現する GGT 陽性巣は、この肝癌形成過程に出現する増生結節の運命に非常に似ていると思われる。Solt and Shklar<sup>14</sup> の報告は 0.5 % DMBA ミネラルオイル溶液をハムスター頬嚢に週 2 回、3 週まで計 6 回塗布後の GGT 陽性巣の数は  $134 \pm 80$  foci /  $10\text{cm}^2$  が、8 日後には  $11 \pm 18$  foci /  $10\text{cm}^2$  で急激な減少を示した。Odajima ら<sup>15</sup> の報告は 0.5 % DMBA ミネラルオイル溶液を週 2 回、5 週まで、計 10 回塗布後の GGT 陽性巣の数は  $345 \pm 133$  foci /  $10\text{cm}^2$  で、その後 10 週、すなわち実験開始後 15 週では  $207 \pm 78$  foci /  $10\text{cm}^2$  で、急激な減少は実験開始後、15 週と 22 週の間で行っている。

Solt and Shklar<sup>14</sup> の実験では計 6 回塗布で、われわれの実験における 10 回塗布と異にするが、1 週後の急激な GGT の減少は類似した所見である。われわれの実験は Odajima ら<sup>15</sup> の実験と同様の処置であるが、DMBA 塗布中止 10 週では、Odajima ら<sup>15</sup> の実験では GGT 陽性巣の数の存続が  $207 \pm 78$  foci /  $10\text{cm}^2$  とわれわれの実験の 10 週 ( $35 \pm 24$  foci /  $10\text{cm}^2$ ) との結果と著しい差が認められる。しかし、22 週以後、25 週以後

(Table 1) ではほぼ GGT 陽性巣の数には差は認められない。この差異は今後残された問題である。

実験的口腔癌形成において 2 段階発癌実験の種々の報告がある。実験動物としてハムスターを用いた頬嚢癌形成過程において、promoter として 10% エタノール、あるいは co-carcinogen として Tween 60<sup>26</sup>、croton oil<sup>22</sup> は頬嚢癌形成を促進するといわれている。TPA はハムスター皮膚癌形成実験において、promoter として作用しないという報告<sup>24</sup> は、GGT 陽性巣の解析で、数、大きさには影響は認められなかったのはハムスターという動物種の差による結果かもしれない (Table 1, 2)。

今後、ハムスター口腔癌形成実験において、TPA 以外の promoter を検索する予定である。

## 文 献

1. Hanes, C. S., Hind, F. J. R., and Isherwood, F. A. : Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione, *Nature*, 166 ; 288—292, 1950.
2. Albert, Z., Orlowska, J., Orlowski, M., and Szewczuk, A. : Histochemical and biochemical investigations of gamma-glutamyl transpeptidase in the tissues of man and laboratory rodents, *Acta histochem.*, 18 ; 78—89, 1964.
3. Albert, Z., Rzuclido, Z., and Starzyk, H. : Biochemical and histochemical investigations of the gamma glutamyl transpeptidase in embryonal and adult organs of man, *Acta histochem.*, 37 ; 74—79, 1970.
4. Fiala, S. and Fiala, E. S. : Activation by chemical carcinogens of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in rat and mouse liver, *JNCI.*, 51 ; 151—158, 1973.
5. Solt, D., Medline, A., and Farber, E. : Rapid emergence of carcinogen induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis, *Am. J. Path.*, 88 ; 595—618, 1977.
6. Ogawa, K., Solt, D. B., and Farber, E. : phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver



- carcinogenesis, *Cancer Res.*, 40;725—733, 1980.
7. Mori, M., Kaku, T., and Dempo, K.: Histochemical investigations of precancerous lesions induced 3'-Me-DAB in rat liver, *Gann Monogr.*, 25;103—114, 1980.
  8. 千坂礼靖, 金子愛子, 伝法公麿: 3'-Me-DAB によるラット発癌過程における GGT 活性の生化学的組織化学的研究, *札幌医誌*, 51; 91—104, 1982.
  9. De Young, L. M., Richards, W. L., Bonzelet, W., Tsai, L. L., and Boutwell, R. K.: Localization and significance of  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase in normal and neoplastic mouse skin, *Cancer Res.*, 38; 3697—3701, 1978.
  10. Klein, A. J. P., Nelson, K. G., Shah, Y., and Slaga, T. J.: Simultaneous appearance of keratin modifications and  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase activity as indicators of tumor progression in mouse skin papillomas, *JNCI*, 70; 161—168, 1983.
  11. Chiba, M., Maley, M. A., and Klein-Szanto, A. J. P.: Sequential study of  $\gamma$ -glutamyltransferase during complete and two-stage mouse skin carcinogenesis, *Cancer Res.*, 46; 259—263, 1986.
  12. Fiala, S., Fiala, A. E., Keller, R. W., and Fiala, E. S.: Gamma glutamyl transpeptidase in colon cancer induced by 1,2-dimethylhydrazine, *Arch. Geschwulstforsch*, 47; 117—122, 1977.
  13. Solt, D. B.: Localization of gamma-glutamyl transpeptidase in hamster buccal pouch epithelium treated with 7,12-dimethylbenz (a) anthracene. *JNCI*, 67; 193—200, 1981.
  14. Solt, D. B. and Shklar, G.: Rapid induction of gamma-glutamyl transpeptidase-rich epithelial clones in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene treated hamster buccal pouch, *Cancer Res.*, 42; 385—295, 1982.
  15. Odajima, T., Solt, D. B., and Solt, L. C.: Persistence of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-positive foci during hamster buccal pouch carcinogenesis, *Cancer Res.*, 44; 2062—2067, 1984.
  16. 小田島哲世, 館山美樹, 賀来 亨, 奥山富三: ハムスター頬嚢癌における  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase 活性の多彩性, *東日本歯誌*, 4; 23—28, 1985.
  17. Hennings, H., Devor, D., Wenk, M. L., Slaga, T. J., Former, B., Colburn, N. H., Bowden, G. T., Elgjo, K., and Yuspa, S. H.: Comparison of two-stage epidermal carcinogenesis by 7,12-dimethylbenz-(a)anthracene or N-methyl-N-nitrosoguanidine in newborn and adult Senca and BALB/C mice, *Cancer Res.*, 41; 773—779, 1981.
  18. Slaga, T. J.: Multistage chemical carcinogenesis in mouse skin: A rational approach to the mechanisms involved and cancer prevention, *最新医学*, 37; 1715—1719, 1982.
  19. Hennings, H., Shores, R., Wenk, M. L., Spangler, E. F., Tarone, R., and Yuspa, S.: Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour promoters, *Nature*, 304; 67—69, 1983.
  20. Enomoto, K. and Farber, E.: Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis, *Cancer Res.*, 42; 2330—2335, 1982.
  21. Tatematsu, M., Nagamine, Y., and Farber, E.: Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver, *Cancer Res.*, 43; 5049—5059, 1983.
  22. Silberman, S. and Shklar, G.: The effect of a carcinogen (DMBA) applied to the hamster buccal pouch in combination with croton oil, *Oral Surg.*, 16; 1344—1345, 1963.
  23. Odukoya, O. and Shklar, G.: Two-phase carcinogenesis in hamster buccal pouch, *Oral Surg.*, 54; 547—552, 1982.
  24. Steidler, N. E. and Reade, P. C.: Initiation and promotion of experimental oral mucosal carcinogenesis in mice, *J. Oral Pathol.*, 15; 43—47, 1986.
  25. Elzay, R. P.: Local effect of alcohol in combination with DMBA hamster cheek pouch, *J. Dent. Res.*, 45; 1788—1795, 1966.
  26. Dachi, S. F.: Effects of polyxyethylene sorbitan monostearate (Tween 60) upon experimental oral carcinogenesis in the hamster, *J. Dent Res.*, 41; 476—483, 1962.